



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

**Avaliação da toxicidade do óleo da semente da *Sterculia striata* em embriões  
de zebrafish**

BRENDA CABRAL DE MOURA

ARACAJU  
2019

BRENDA CABRAL DE MOURA

**Avaliação da toxicidade do óleo da semente da *Sterculia striata* em embriões de zebrafish**

Projeto de pesquisa elaborado pelo LABEN na Universidade Federal de Sergipe para o Trabalho de Conclusão de Curso como requisito para o título de Bacharel em Ciências Farmácia com a orientação da Profa Cristiani Isabel Banderó Walker.

ARACAJU

2019

## AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO ÓLEO DA SEMENTE DA *Sterculia striata* EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH.

O uso de plantas medicinais na medicina popular como tratamento para diversos tipos de patologias é uma prática que vem sendo realizada há centenas de anos. O Brasil, por apresentar uma rica diversidade vegetal, é um dos países onde pode-se observar constantemente o uso de chás, infusões e outras formas de tratamento que tenha origem vegetal pela população. A *Sterculia striata*, popularmente conhecida como “chichá-do-cerrado”, “chichá”, “amendoim-da-mata”, “castanha-de-macaco” é uma planta muito utilizada pela população pelas suas diversas atividades biológicas tais como anti-inflamatória, anti-cancerígena e imunomoduladora, as quais já foram comprovadas cientificamente. No entanto, é necessário verificar a segurança dessa planta. Para isso se utilizou o *Danio rerio*, conhecido popularmente como zebrafish ou peixe-paulistinha, que é um excelente modelo animal para estudos toxicológicos. Isso se deve ao seu desenvolvimento rápido e externo, além da semelhança genética e de desenvolvimento embrionário com mamíferos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi verificar a possível atividade tóxica do óleo da *Sterculia*. Para isso, diferentes concentrações ( 3.125, 6.25, 12.50, 25, 50, 100, 200 e 400 mg/kg) do óleo desta planta foram testadas frente aos embriões de zebrafish por até 96 horas. As maiores concentrações do óleo de *Sterculia striata* apresentaram uma significativa mortalidade dos embriões quando comparados com o controle, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento, isto pode indicar uma atividade direta na formação de órgãos vitais do animal. Embora, não tenham sido observadas malformações nos embriões sobreviventes, necessita-se de maiores estudos para delimitar uma curva de dose segura para o uso deste óleo.

Palavras-chave: *Sterculia striata*, chichá--do-cerrado, *Danio rerio* , toxicidade, teratogenicidade.

## SUMÁRIO

|     |                                  |    |
|-----|----------------------------------|----|
| 1   | <b>INTRODUÇÃO</b>                | 5  |
| 2   | <b>OBJETIVOS</b>                 | 7  |
| 2.1 | Objetivo geral                   | 7  |
| 2.2 | Objetivos específicos            | 7  |
| 3   | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b>     | 8  |
| 3.1 | <i>Sterculia striata</i>         | 8  |
| 3.2 | Óleo da <i>Sterculia striata</i> | 12 |
| 3.3 | Toxicidade em zebrafish          | 14 |
| 4   | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>       | 16 |
| 4.1 | Animais                          | 16 |
| 4.2 | Ensaio de toxicidade             | 16 |
| 4.3 | Análise Estatística              | 17 |
| 5   | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>    | 18 |
| 6   | <b>CONCLUSÃO</b>                 | 20 |
| 7   | <b>REFERÊNCIAS</b>               | 21 |

## 1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade tem um papel evolutivo muito importante, uma vez que ao longo da evolução humana, nós aprendemos a fazer seleção de plantas nativas ao redor do mundo a fim de curar doenças e com isso foi dando inicio a exploração da flora ao redor do mundo. Os primeiros registros da utilização de plantas medicinais no mundo foi a 1.500 a.c. por anotações egípcias de inúmeras plantas como a Ginseng (*Panax* spp.), hoje em dia utilizada pela industria farmacêutica como matéria prima de fitoterápicos (FIRMO, 2012)

O Brasil é um país que possui uma flora muito rica em diversidade genética e que ainda é pouco explorado. Além disso, faltam incentivos para pesquisas científicas exploratórias dos subprodutos das plantas nativas como as amêndoas, que são de alto valor nutritivo para a alimentação humana. Em especial as regiões do norte do Brasil como Piauí e Maranhão possuem espécies ainda pouco conhecidas e com alto potencial para a exploração das amêndoas. Uma amêndoa muito utilizada pela população dessa região é a *Sterculia striata* (CARVALHO, 2008).

A família Sterculinaceae tem cerca de 60 gêneros e 700 espécies, mas no Brasil são encontrados por volta de 12 gêneros, dentre eles a *Sterculia* que possui em torno de 60 espécies que se encontram pelas regiões tropicais do planeta como Ásia, África e America do sul e central (TARODA, 1980).

A *Sterculia striata* é uma planta originária da Malásia e da Índia e que se adaptou ao clima de algumas regiões brasileiras como o cerrado. Essa espécie pertence a família Sterculinaceae e é conhecida popularmente como chichá-do-cerrado e chichá. O fruto desta planta é muito consumido pela população por seu alto valor nutritivo, rico em proteínas e com baixo teor de gorduras e minerais (POLICARPI, *et al.*, 2017).

A semente da chichá é conhecida popularmente por castanha-de-macaco e amendoim-da-mata e é consumida pela população de diversas formas como crua, cozida e torrada. Estas sementes possuem um rico potencial nutricional, uma vez que são ricas em macronutrientes como lipídios, carboidratos e proteínas, com teores 28,6%, 45,8% e 22,5% respectivamente. Além dos macronutrientes, mas sementes da *Sterculia striata* é rica em ácidos graxos ciclopropenóidicos, sendo os

ácidos estercúlico e e malvático são os mais comumente encontrados nas sementes(CHAVES, *et al.*, 2004).

Devido a grande utilização popular da *Sterculia striata* são necessários estudos toxicológicos para verificar a segurança desta planta. Popularmente conhecido como zebrafish, o *Danio rerio* é um peixe tropical teleósteo da família Cyprinidae que mede de 3 a 4 centímetros e de fácil manejo. As fêmeas podem colocar cerca de trezentos ovos por acasalamento, atribuindo alta fecundidade à espécie, característica que desperta interesse pela utilização do peixe como modelo experimental. Os ovos ainda são de desenvolvimento externo e, assim como as larvas, transparentes tornando a microscopia simples uma útil ferramenta de análise (Buske, 2014). Os embriões se desenvolvem em larvas em até 7 dias após a fertilização e a maioria dos órgãos e tecidos (cérebro, olho, coração, intestino e ouvido) já estão formados em 5 dias tornando viável o estudo dos diferentes estágios do desenvolvimento (Parichy *et al.*, 2009).

Outro grande valor do zebrafish como modelo está na sua semelhança biológica quando comparado com outros organismos evolucionariamente mais complexos (Davis *et al.*, 2014). O genoma do peixe-zebra já foi completamente sequenciado e sabe-se que 70% de seus genes são homólogos aos de humanos, assim como mais de 80% dos genes associados a doenças humanas podem ser relacionados no modelo (Howe *et al.*, 2013). O modelo zebrafish permite a avaliação de diversos aspectos do desenvolvimento da doença humana uma vez que seus tecidos podem ser analisados através de imagens em tempo real com o auxílio de cromógenos (SINGLEMAN, 2012).

Dessa maneira, esse trabalho teve como objetivo avaliar a potencial atividade tóxica do óleo da *Sterculia striata* no desenvolvimento embrionário de zebrafish.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial efeito tóxico e teratogênico do óleo da semente *Sterculia striata* em embriões de zebrafish.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a mortalidade dos embriões de zebrafish nos diferentes pontos temporais de 24, 48, 72 e 96 horas;
- Investigar as possíveis malformações causadas pelo óleo da *Sterculia striata* na fase embrionária deste.

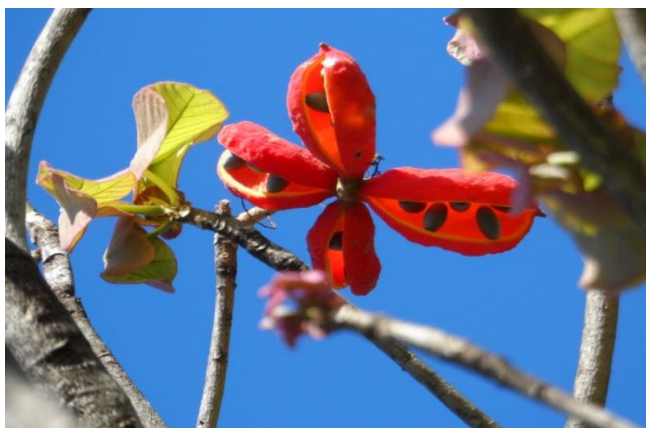
### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Sterculia striata*

A *Sterculia striata*, popularmente conhecida como “chichá”, “amendoim-da-mata”, “castanha-de-macaco” ou “chichá-do-cerrado” (ALMEIDA, *et al.*, 1998). É uma planta originária da Índia e da Malásia e aqui no Brasil e abrange o território da Amazônia até o Piauí, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, além de São Paulo e Goiás (MOTA, *et al.*, 2014). Se trata de uma árvore que origina um fruto seco e com uma cápsula lenhosa, suas sementes são oleaginosas e são a parte comestível que possui concentrações consideráveis de cálcio, ferro e zinco e são consideradas de alto valor nutritivo pois apresenta um teor de 28,6% de lipídios, 22,5% de proteínas e 45% de carboidratos, macronutrientes essenciais a vida (MOTA, *et al.*, 2014; CHAVES, *et al.*, 2004). Seu fruto é utilizado tanto para consumo humano como para alguns tratamentos populares, além de ser uma árvore ornamental, suas amêndoas são consumidas pela população cruas, torradas ou cozidas, mas pode ser usada também como madeira na construção de móveis, caixas, palitos de fósforo (ALMEIDA, *et al.*, 1998). Um problema relacionado ao consumo direto das sementes são seus altos teores de lipídios, pois devem ser consumidos com moderação, embora a amêndoa da chichá quando comparadas com outras amêndoas chega a ter até 48% menos lipídios que a castanha de caju e 149% inferior a castanha-do-brasil, sendo assim possuem um baixo teor calórico do que todas as castanhas referidas no trabalho (CARVALHO, 2008). Há estudos que utilizam o óleo da castanha para os testes de biodiesel, avaliando suas propriedades químicas, as quais estão na faixa das aceitáveis para ser utilizada como fonte renovável, sendo uma alternativa de desenvolvimento econômico na região semi-



árida, pois a planta começa a produzir frutos 18 a 24 meses após o plantio e produz cerca de 40 kg de castanha anuais (MANGAS, 2015).



**Figura 1** Fruto maduro da *S. striata*

A caracterização fitoquímica da casca do caule da *Sterculia s.* por métodos cromatográficos demonstrou a presença de flavonoides, alcalóides, outros compostos fenólicos e ácidos graxos, demonstrando um perfil químico bastante diversificado. Além disso, foram isolados esteróides como o sitosterol, estigmasterol e sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, e quatro triterpenóides pentacíclicos, o lupeol, 3- $\beta$ -O-acil lupeol, lupenona e ácido betulínico. Nesse estudo foi analisada também a atividade antioxidante do extrato etanólico dessa planta e foi determinada pela sua capacidade de sequestrar o radical livre DPPH por espectrofotometria UV no comprimento de onda 516 nm e os resultados apontaram que sua atividade antioxidante foram inferiores a 50% (COSTA *et al.*, 2010). As folhas da *Sterculia s.* são coriáceas, típicas do cerrado, com bordas levemente onduladas e seu contorno foliar é cordiforme de cor verde quando ainda jovens e ao ficarem adultas vão perdendo a pigmentação, tornando-se marrons. Sua secção transversal é obtusa, tendo a superfície superior do limbo rugosa e desprovida de pêlos e a parte inferior é revestida por pêlos (pilosa). No estudo fotoquímico das folhas não foram encontrados a presença de taninos, grupo de importantes propriedades como antimicrobianas e antifúngicas, não foram encontrados heterosídeos digitálicos de onde são extraídos os cardioglicosídeos, com poderes cardioativas. Foram evidenciados uma fraca presença de Heterosídeos flavonóides, mas isso pode ser devido a época da colheita das folhas, uma vez que essa molécula é armazenada nos tecidos superficiais não sendo constante durante o ano. Não foram encontrados

presença de heterosídeos saponínicos, assim como também não se evidenciou presença de heterosídeos antraquinônicos, os quais são responsáveis por atividade laxativa, purgativa e anti-inflamatória. Detectou-se grande presença de mucilagem que apresentam atividade emoliente, porém deve-se resaltar que a presença desses metabólitos podem variar de acordo com a época e variação ambiental (MOTA, *et al.*, 2014).

Tais atividades podem estar relacionadas a produção de um grande número de metabólitos secundários pelas plantas da família Malvaceae, como triterpenos, flavonoides, alcaloides e cumarinas. No caso da *Sterculia striata*, estudos com extratos de diferentes partes do vegetal mostraram a presença de lupeol, sitosterol e stigmasterol como compostos majoritários, cuja literatura indica potencial atividade anti-inflamatória, anti-cancerígena e imunomoduladora (GERLAI, 2000; SALEEM, 2004), tornando-a assim um possível alvo de estudos para descoberta de novos medicamentos.

O lupeol é um triterpeno que é encontrado em plantas frutíferas e ervas medicinais, em que também está presente como constituinte da *Sterculia s.*, e possui muitas propriedades benéficas como anti-inflamatória, antiartrítico, antioxidante, antimutagênico, inibe as prostaglandinas e produz citocinas. No estudo proposto mostra que essa molécula tem efeitos antitumorais quando testado em camundongos. A aplicação tópica dessa substância inibiu a indução da hiperplasia na epiderme quando comparado com o controle (SALEEM *et al.*, 2004).

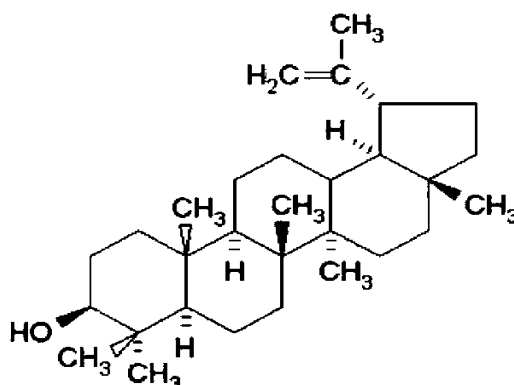
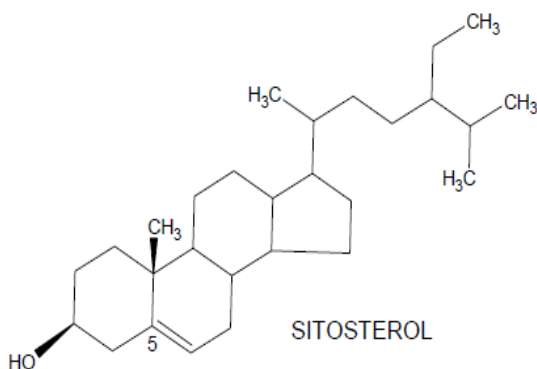


Figura 2 Estrutura Química do Lupeol

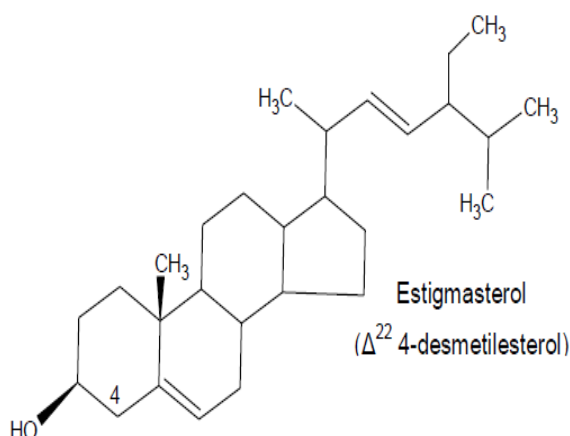
Os fotoesteroides são substâncias encontradas em algumas nas plantas e tem caráter esteroidais, ou seja terpenóides tetracíclicos e tem em sua estrutura um esqueleto carbônico formado pelo anel ciclopentanoperidrofenantrênico.(OLIVEIRA, 2007)

O  $\beta$ -sitosterol são fitoesteróides que se diferencia do colesterol apenas pela presença da calda lateral com dez carbonos e dos outros fitoesteróides pela presença de um grupo etila no carbono C-14 e pertence ao grupo dos colestanos. Com relação a suas características físico-químicas, ele é um sólido cristalino amorfo de baixa solubilidade em água e boa solubilidade em solventes orgânicos. Possui uma insaturação no C-5, aqual pode ser halogenada ou oxidada quando em contato com o ar , aumento da temperatura, ação da luz, radicais livres e podem gerar radicais como 7-ceto, 7-hidroxicitosterol, 5,6-hidroxi, 5,6-époxi, onde esses derivados tem propriedades biológicas interessantes. Estudos apontam que o  $\beta$ -sitosterol melhora os sintomas e previne a incontinência urinária e com aliado ao combate da hiperplasia benigna da próstata (SANTOS, 2014). Possui atividade anti-inflamatória semelhante a hidrocortisona e a oxifenbutazona, além de ter caráter independente do eixo adrenal hipofisário , antipirética semelhante ao AAs, embora não haja ação analgésica, mas pode ter um valor terapêutico significativo(GUPTA, *et al.*, 1980). O 9-sitosterol quando adicionado a dietas de animais com câncer de colón promovem a redução do tumor e a neutralizam os sinais proliferativos associados a carcinogênese. O f-sitosterol apresentou uma influencia na proteção do câncer de colón induzido e as alterações induzidas por substâncias carcinogênicas foram retardadas quando a população do estudo foi submetida a quantidades de f3-sitosterol (CALKINS, *et al.*, 1984).



**Figura 3 Estrutura Química do Sitosterol**

O estigmasterol também é um fitoesteróide que tem como principal função farmacológica é a hipocolesterolêmica, mas também antimutagênica, antioxidante, anti-inflamatória. Sua estrutura é similar a outros esteroides com quatro anéis e o ciclopentanoperidrofenantreno ligada ao C-17 e possui uma insaturação adicional no C-22. São cristais amorfos, insolúveis a água e solúveis em solventes orgânicos (SANTOS, 2014). Em uma estudo feito na *Gleditsia sinensis*, Lim e colaboradores (2005) dentre os constituintes dessa planta, o estigmasterol foi o que mais apresentou atividade antimutagênica, havendo uma redução no fator de indução contra mutagenes, embora ainda é necessário estudo in vivo para o uso do estigmasterol para esse fim. Além disso, tem eficácia na regulação de hormônios na tireoide (T3 e T4), com potencial hipoglicemiante, pois estimula a insulina e reduz o estresse oxidado pela inibição da atividade das enzimas responsáveis por essa ação (CALKINS, *et al.*, 1984).



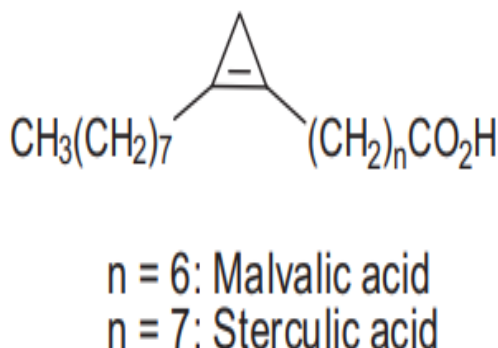
**Figura 4 Estrutura Química do Stigmasterol**

Porém, novas moléculas de origem natural possam um dia chegar ao mercado farmacêutico, é necessário primeiro uma avaliação de sua possível atividade tóxica. O zebrafish tornou-se um modelo vertebrado de destaque em estudos toxicológicos. (GARCIA *et al.*, 2016; MACRAE, 2015).

### 3.2 Óleo da *Sterculia striata*

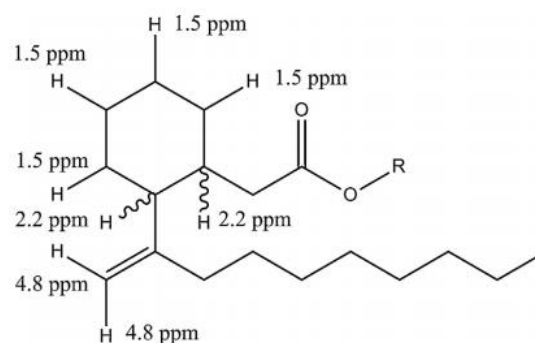
A semente da *Sterculia striata* é a parte que é consumida pela população e em sua constituição possui ácidos graxos ciclopropenóidicos, como o ácido estercúlico e o ácido malválico. A porcentagem de material insaponificável do óleo (1,5%) comparável com outros óleos como por exemplo o da castanha de caju, além do seu índice de refração ( $n_D^{20}$  1,465), saponificação (175 mg KOH.g<sup>-1</sup>) e iodo (66,3g iodo/100g) do óleo dessa noz de chichá está próximo a faixa do azeite de oliva. Seu índice de acidez foi de (0,81 mg KOH.g<sup>-1</sup>) e em sua análise em CCDC da fração insaponificável do óleo foram identificados triterpenoides como 24-Metilenocicloartanol, Sitosterol e Stigmasterol (CHAVES, *et al.*, 2004).

O óleo da semente é rico em ácidos graxos contendo ciclopropenos os quais possuem efeitos carcinogênicos no homem quando ingeridos (MANGAS, 2015). O ácido estercúlico é um inibidor da  $\Delta$ -dessaturase, a qual é responsável pela conversão do ácido esteárico em ácido oleico, e isso o torna nocivo ao ser humano, pois este componente pode influenciar na permeabilidade das membranas e inibir a reprodução (CHAVES, *et al.*, 2004).



**Figura 5** Ácido malválico e ácido estercúlico

Em um estudo que se analisou através de diferentes metodologias o comportamento térmico do óleo da semente da *Sterculia striata* e o resultado foi que este é estável a uma temperatura de até 150° C, acima disso há uma ruptura do anel ciclopropeno, com formação de vários produtos, sendo o principal deles contém um anel de seis membros e uma ligação dupla em uma cadeia terminal (MANGAS, 2015).



**Figura 6** Principal produto formada após a decomposição do anel ciclopropeno

A análise dos antinutrientes do óleo extraído da chichá, foram encontrados altos teores de fitatos (10,6 mg/g) quando comparados com óleos de outras castanhas. O principal ácido graxo saturado encontrado foi o ácido palmítico, embora em menor proporção do que no óleo de dedê (36,8%), e o principal ácido graxo insaturado é o ácido oléico na amêndoa torrada, sendo assim uma boa fonte de monoinsaturados (SILVA, 2011).

### 3.3 Toxicidade em Zebrafish

A toxicologia é responsável pelo estudo da interação do organismo vivo quando entram em contato com as substâncias químicas, podendo ter efeitos tóxicos leves ou permanentes. Os testes de toxicidade são de extrema importância para o registro e a autorização de produtos químicos, fitofarmacêuticos, veterinários e aditivos alimentares (BRAUNBECK, *et al.*, 2015).

O teste de toxicidade em embriões em *Danio rerio* é uma alternativa a ser utilizada, já que não é necessário utilizar os peixes na fase adulta nos testes, isso implica em não serem caracterizados na Diretriz Europeia 2010/63 relacionada a proteção dos animais que são cobaias dos testes científicos (BRAUNBECK, *et al.*, 2015).

O *Danio rerio* é popularmente conhecido como *zebrafish*, teleósteo da família Cyprinidae. Este peixe tropical mede de 3 a 4 centímetros e é de fácil manejo. As

fêmeas podem colocar cerca de trezentos ovos por acasalamento, atribuindo alta fecundidade à espécie, característica que desperta interesse pela utilização do peixe como modelo experimental. Os ovos ainda são de desenvolvimento externo e, assim como as larvas, são transparentes o que torna a microscopia simples uma útil ferramenta de análise (BUSKE, 2016). Os embriões se desenvolvem em larvas em até sete dias após a fertilização e a maioria dos órgãos e tecidos (cérebro, olho, intestino, coração, intestino e ouvido) já estão formados em cinco dias tornando viável o estudo dos diferentes estágios do desenvolvimento (PARICHY *et al.*, 2009).

Outro grande valor do zebrafish como modelo está na sua semelhança biológica quando comparado com outros organismos evolucionariamente mais complexos. O genoma do peixe-zebra já foi completamente sequenciado e sabe-se que 70% de seus genes são homólogos aos de humanos, assim como mais de 80% dos genes associados a doenças humanas podem ser relacionados no modelo (HOWE *et al.*, 2013). Este modelo permite a avaliação de diversos aspectos do desenvolvimento da doença humana uma vez que seus tecidos podem ser analisados através de imagens em tempo real com o auxílio de cromógenos (SINGLEMAN, 2012).

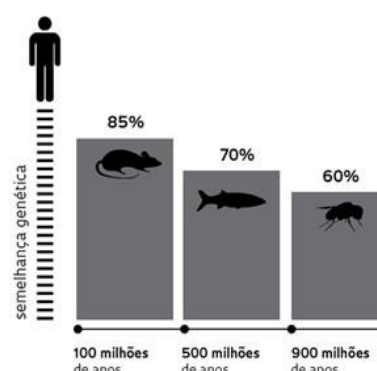
## Os modelos e suas vantagens

Taxa de reprodução elevada, baixo custo de manutenção e desenvolvimento do embrião fora do corpo materno são alguns dos atrativos do *zebrafish*

|                               |  DROSÓFILA |  ZEBRAFISH |  CAMUNDONGO |
|-------------------------------|---|---|--|
| FECUNDAÇÃO                    | Interna   | Externa   | Interna  |
| DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO    | Externo   | Externo   | Interno  |
| EMBRIÃO                       | Não transparente  | transparente  | Não transparente   |
| PRODUÇÃO DE FILHOTES          | 100 ovos/dia  | 100 ovos/dia  | 10 filhotes/ 2 meses   |
| TEMPO ATÉ A IDADE REPRODUTIVA | 20 dias   | 60 a 90 dias  | 85 dias  |
| MANUTENÇÃO DIÁRIA             | -   | R\$ 0,60  | R\$ 8,00   |
| PLANO CORPORAL                | Invertebrado, 6 patas e asas  | Vertebrado, sem patas   | Vertebrado, 4 patas  |

PONTE JOSÉ XAVIER NETO / LNBIO, MONICA RYFF VIANNA / PUC-RS E DENIS ROSEMBERG / UNCHAPECO

### Comparação com o ser humano



Tempo de separação evolutiva

**Figura 7 Comparação de vantagens entre modelos animais para uso de análise de toxicidade.**

Assim, o zebrafish compreende um excelente modelo para a avaliação da toxicidade de compostos e a biossegurança de possíveis novos produtos farmacêuticos. A toxicologia do zebrafish é muito menos dispendiosa e pode ser realizada rapidamente em grandes números de compostos em paralelo. Uma das vantagens do uso deste peixe é que os produtos químicos ou as drogas novas são facilmente apresentados via adição à água, análoga à adição de produtos ao meio de cultura de células, e normalmente requer apenas um volume total de 100 µL durante o desenvolvimento, sendo assim necessário muito pouco composto de teste quando comparado aos estudos de dosagem em mamíferos (LIU *et al.*, 2013). Dessa maneira, neste projeto iremos examinar a possível atividade tóxica do óleo bruto de *Sterculia striata* no desenvolvimento de embriões de zebrafish.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados peixes zebrafish machos e fêmeas com mais de 18 meses de idade de *zebrafish* (linhagem *wild-type* AB – Zebrafish International Resource Center, Eugene, OR) mantidos em aquários sob condições básicas de laboratório em ciclo de 14 horas no claro e 10 horas no escuro a 28° C em água com pH e salinidade controladas. Os ovos não fertilizados ou irregulares foram descartados e os viáveis foram transferidos para placas de 24 poços com até 2 horas pós-fertilização. Os embriões foram classificados de acordo com Kimmel et al (1995). Após os experimentos, os embriões foram submetidos à eutanásia com tricáína 4% (SIGMA) diluída em meio E2 por 10 a 20 minutos.

### 4.2 Ensaio de toxicidade

Os ensaios de toxicidade foram realizados de acordo com as diretrizes da OECD N ° 236: *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. Os experimentos foram conduzidos em placas de 24 poços (Costar® 24Well Cell Culture Cluster, Corning Incorporated, NY, USA) com cinco embriões (estágio de 4 a 32 células) por tratamento/concentração a 28° C. O óleo da semente da *Sterculia striata* foi diluído



em solução de DMSO 0,05% / meio E2. Os embriões foram expostos a diferentes concentrações (3.125, 6.25, 12.50, 25, 50, 100, 200 e 400mg/kg) obtidas baseando-se nas utilizadas em tratamento *in vivo* e todos os ensaios foram realizados em triplicata. Após tratamento, os embriões foram monitorados utilizando-se lupa LEICA M205C em diferentes pontos temporais (24, 48, 72 e 96 horas pós-fertilização) e observados para mortalidade (coagulação embrionária) e malformações morfológicas (edema de saco vitelínico, curvatura do corpo, olho, cabeça, edema de pericárdio, ponta da cauda, circulação, pigmentação e bexiga natatória).

#### 4.3 Análise Estatística

Os dados estatísticos foram processados no *software* GraphPad Prism (GraphPad 7 Software, La Jolla, CA, USA) por *two-way* ANOVA seguido do pós teste de Dunnett para calcular as diferenças estatísticas na sobrevivência dos diferentes grupos experimentais. As barras de erro mostradas indicam SEM e os asteriscos indicam significância: \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Quando  $p > 0,05$  o resultado foi considerado não significativo (n.s.).

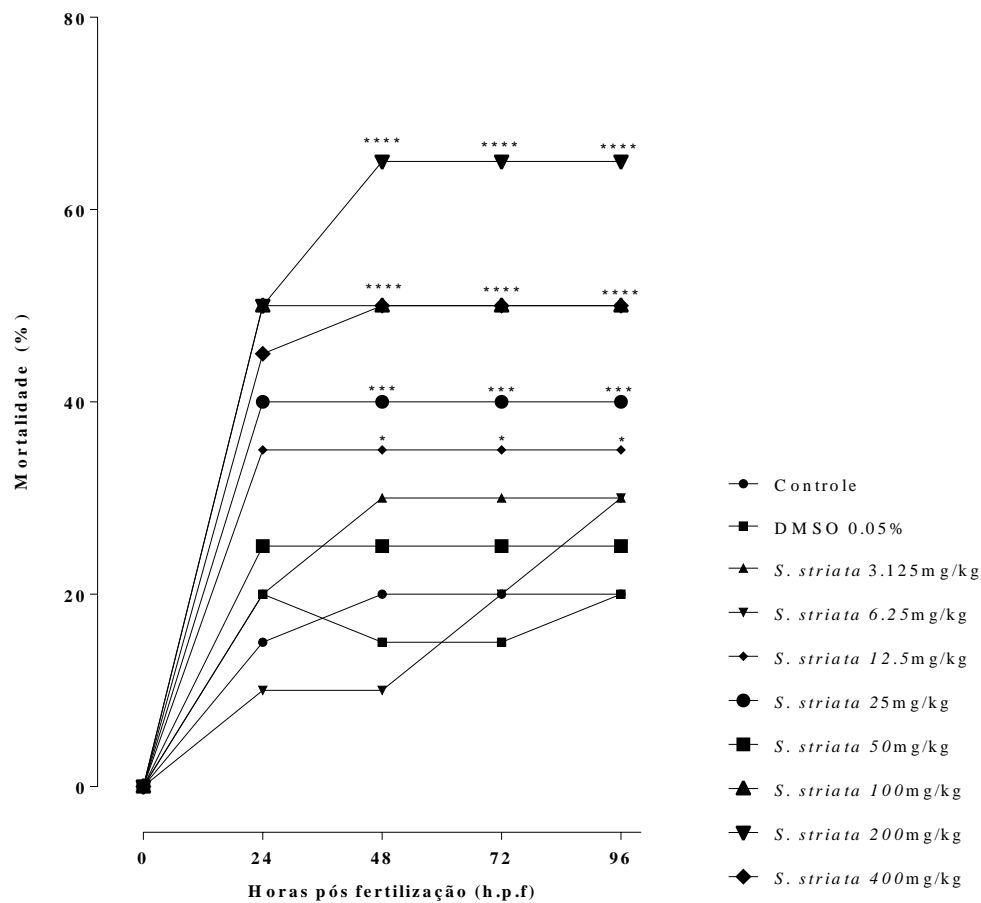
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a possível toxicidade da exposição de embriões do zebrafish ao óleo da semente da *Sterculia striata* em diferentes concentrações (3.125, 6.25, 12.50, 25, 50, 100, 200 e 400mg/kg), a mortalidade e a malformação foram avaliadas durante um período de observação contínua.

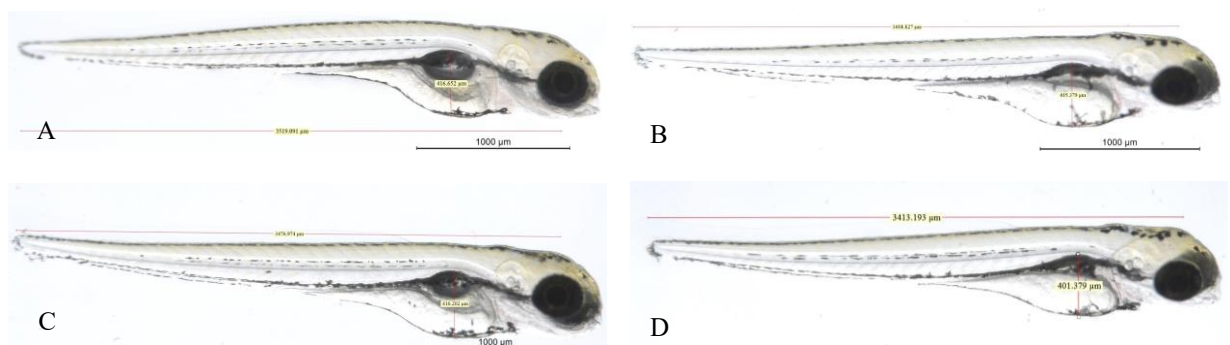
Como observado na Figura 6, os embriões expostos as maiores concentrações do óleo da *Sterculia striata* apresentaram um significativo aumento na mortalidade a partir da concentração de 100 mg/kg quando comparado aos embriões mantidos em meio E2, como controle negativo, e àqueles expostos a solução de DMSO 0,05%, usada para diluir as substâncias nas diferentes concentrações.

Apesar do notável aumento na taxa de mortalidade, não foram observadas malformações tais como edema do saco vitelino, eixo do corpo dobrado, olho, focinho, mandíbula, edema pericárdico do otólito, cérebro, somito, nadadeira caudal, nadadeira peitoral, circulação, pigmentação, comprimento do tronco e bexiga natatória recorrentes nos embriões e larvas expostos ao óleo da *Sterculia striata*. Todas as concentrações demonstraram um período de eclosão normal de embriões de 48 h a 72 horas (Figura 7).

Os resultados do ensaio de toxicidade em embriões de zebrafish corroboram com outros estudos de toxicidade realizados com extratos em altas concentrações de outras plantas do gênero *Sterculia* como a sementes da *Sterculia guttata*, em que o extrato etanólico exibiram 100% de letalidade em um período de 24 horas de exposição a uma concentração de 500 ppm. Consequentemente, seu uso tem sido utilizados para possíveis tratamentos farmacológicos como para o uso como larvicidas e controle ambiental de mosquitos e outras pragas (KATADE *et al.*, 2006; MOGBOJURI *et al.*, 2016).



**Figura 8. Mortalidade dos embriões de zebrafish expostos a soluções do óleo DA *Sterculia striata*.** Os embriões foram expostos ao meio E2 (controle negativo), DMSO 0,05% (utilizado como diluente) e ao óleo em diferentes concentrações de 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 e 400mg/kg. A significância foi considerada como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparados ao grupo controle.



**Figura 9. Avaliação das possíveis malformações congênicas das larvas expostas ao óleo bruto de *Sterculia striata*.** As larvas sobreviventes apresentaram desenvolvimento embrionário normal tanto as maiores concentrações (C, larva exposta a concentração de 400mg/kg) quando nas menores concentrações (D, larva exposta a concentração de 3.125mg/kg), quando comparadas ao grupo controle (A, expostas ao meio E2) e DMSO (B, expostas a solução de DMSO 0,05%).

## 6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se verificar que as maiores concentrações do óleo da semente da *Sterculia striata* apresentaram toxicidade frente aos embriões de zebrafish quando comparado aos embriões mantidos no controle negativo. No entanto, não foram observadas malformações nos embriões e larvas expostos a essa substância.

Com base nesses resultados, conclui-se que o óleo da semente da *Sterculia striata* apesar de ser muito utilizado popularmente, ainda apresenta escassos estudos sobre a composição de seu óleo e sobre a segurança de seu uso. Devido a isso, são necessários maiores estudos sobre a toxicidade desta planta para promover uma maior segurança no seu uso.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, SP de et al. Cerrado: espécies vegetais úteis. **Planaltina: Embrapa-CPAC**, v. 464, 1998.
- BRAUNBECK, Thomas et al. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16247-16261, 2015.
- BUSKE, Christine; GERLAI, Robert. Diving deeper into Zebrafish development of social behavior: analyzing high resolution data. **Journal of neuroscience methods**, v. 234, p. 66-72, 2014.
- CALKINS, B. M. et al. Diet, nutrition intake, and metabolism in populations at high and low risk for colon cancer. Nutrient intake. **The American journal of clinical nutrition**, v. 40, n. 4 Suppl, p. 896-905, 1984.
- CHAVES, Mariana H. et al. Caracterização química do óleo da amêndoa de *Sterculia striata* St. Hil. et Naud. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 404-408, 2004.
- Chichá (*Sterculia striata* A.St.-Hil. & Naudin), 2017 <<http://www.aplantadavez.com.br/2017/07/chicha-sterculia-striata-ast-hil-naudin.html>> Acesso em: 02/03/2019.
- COSTA, Danielly Albuquerque et al. Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Sterculia striata* St. Hil. et Naudin. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 207-212, 2010.
- DAVIS, Erica E.; FRANGAKIS, Stephan; KATSANIS, Nicholas. Interpreting human genetic variation with in vivo zebrafish assays. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 10, p. 1960-1970, 2014.
- DE CARVALHO, Michelle Garcêz et al. Avaliação dos parâmetros físicos e nutricionais de amêndoas de chichá, sapucaia e castanha-do-gurguéia. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 4, p. 517-523, 2008.
- FIRMO, Wellyson da Cunha Araújo et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de pesquisa**, 2012.
- GARCIA, Gloria R.; NOYES, Pamela D.; TANGUAY, Robert L. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. **Pharmacology & therapeutics**, v. 161, p. 11-21, 2016.
- GERLAI, Robert et al. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 67, n. 4, p. 773-782, 2000.
- GUPTA, M. B. et al. Anti-inflammatory and antipyretic activities of  $\beta$ -sitosterol. **Planta medica**, v. 39, n. 06, p. 157-163, 1980.
- HOWE, Kerstin et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498, 2013.

KATADE, Sushama R. et al. Sterculia guttata seeds extractives-an effective mosquito larvicide. *Indian J Exp Biol*, V.44, n. 8, p. 662 – 5, 2006.

KIMMEL, Charles B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

LIU, Xiaoshan et al. Effects of TDCPP or TPP on gene transcriptions and hormones of HPG axis, and their consequences on reproduction in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic toxicology**, v. 134, p. 104-111, 2013.

MACRAE, Calum A.; PETERSON, Randall T. Zebrafish as tools for drug discovery. **Nature reviews Drug discovery**, v. 14, n. 10, p. 721, 2015.

MANGAS, Maria Beatriz Pereira. *Desenvolvimento de Processos para a Produção de Biocombustíveis pela Alcoólise e Craqueamento Térmico do Óleo de Sterculia striata*. 2015.

MOGBOJURI, Olufunke M.; ADEDAPO, Adeolu A.; ABATAN, Matthew O. Phytochemical screening, safety evaluation, anti-inflammatory and analgesic studies of the leaf extracts of Sterculia tragacantha. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 13, n. 3, p. 221-228, 2016.

MOTA, Tathiane Helena Soares et al. Estudo farmacognóstico das folhas da Sterculia Striata St. Hil. Et. Naid., coletadas em Itapuranga-Go1. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 7, n. 1, 2014.

OECD (2013), *teste nº 236: Teste de toxicidade aguda de embriões de peixe (FET)*, Diretrizes da OCDE para o teste de substâncias químicas, Seção 2, Publicação da OCDE, Paris.

OLIVEIRA, A. B. *Microencapsulamento de stigmasterol proveniente da Musa paradisiaca L., Musaceae*. **Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em Ciências Farmaceuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba**, 2007.

PARICHY, David M. et al. Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. **Developmental dynamics**, v. 238, n. 12, p. 2975-3015, 2009.

PARICHY, David M. et al. Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. **Developmental dynamics**, v. 238, n. 12, p. 2975-3015, 2009.

POLICARPI, Priscila de Britto et al. *Potencial nutricional, perfil químico e atividade antioxidante da castanha da chichá (S. Striata St Hil e Naud) e seus subprodutos*. 2017.

SALEEM, Mohammad et al. Lupeol modulates NF-κB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. **Oncogene**, v. 23, n. 30, p. 5203, 2004.

SANTOS, Rauldenis Almeida Fonseca. *Avaliação das propriedades biológicas dos derivados sintéticos do beta-sitosterol e triperpenos*. 2014, p. 106, Dissertação de Mestrado em Química da Universidade Federal da Bahia.

SILVA, Aline Gomes de Moura; FERNANDES, Kátia Flávia. Composição química e antinutrientes presentes nas amêndoas cruas e torradas de chicha (*Sterculia striata* A. St. Hill & Naudin). 2011.

SINGLEMAN, Corinna; HOLTZMAN, Nathalia G. Analysis of postembryonic heart development and maturation in the zebrafish, *Danio rerio*. **Developmental Dynamics**, v. 241, n. 12, p. 1993-2004, 2012.

TARODA, Neusa et al. O genero *sterculia* L. no Brasil: revisão taxonomica e aspectos da biologia da reprodução. 1980.

**Zebrafish as an animal model.** **Tecnoblog.net, 2013. Disponível em <**  
**<https://tecnoblog.net/247956/referencia-site-abnt-artigos/>>Acesso em: 03/04/2019.**